"نشریه علوم زراعی ایران"
جلد بیست و پنجم، شماره ۱، بهار ۱۴۰۲

مقاله پژوهشی

DOR: 20.1001.1.23223243.2021.19.1.29.0

واکنش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ژرم‌پلاسم وحشی و زراعی نخود (*Cicer* spp.) به تنش سرما

Physiolgical and biochemical responses of wild and cultivated chickpea (*Cicer* spp.) germplasm to cold stress

معروف خلیلی[۱]، همایون کانونی[۲]و کامبیز بهمنی[۳]

چکیده

خلیلی، م.، ه. کانونی و ک. بهمنی. ۱۴۰۲. واکنش های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ژرم پلاسم وحشی و زراعی نخود (*Cicer* spp.) به تنش سرما. **نشریه علوم زراعی ایران. ۲۵ (۱): ۸۷ -۷۱.**

این تحقیق به‌منظور بررسی واکنش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ژنوتیپ‌های نخود به تنش سرما و شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل در شرایط مزرعه و کنترل شده اجرا شد. در این تحقیق، ۱۰ ژنوتیپ نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.)، هشت ژنوتیپ نخود وحشی (*Cicer reticulatum*) و دو شاهد حساس (لاین ILC533) و متحمل به سرما (رقم سارال) در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار به مدت دو سال زراعی (۹۹-۱۳۹۸ و ۱۴۰۰-۱۳۹۹) به‌صورت دیم در ایستگاه تحقیقات کشاورزی سارال کردستان مورد ارزیابی قرار گرفته و صفات مورفولوژیک و فنولوژیک آنها یادداشت‌برداری شدند. ژنوتیپ‌های نخود مورد ارزیابی در شرایط کنترل شده در اطاقک رشد در شرایط کاهش تدریجی دما نیز کشت شده و صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک آن‌ها ثبت شدند. نتایج نشان داد که ژنوتیپ‌های نخود مورد ارزیابی از لحاظ میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز، نشت الکترولیت‌ها و محتوای کلروفیل b، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر داشتند. بر اساس نتایج تجزیه مسیر، وزن ۱۰۰ دانه و پس از آن پایداری غشاء و میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز، بیشترین اثر مستقیم و مثبت را بر عملکرد دانه داشتند. نتایج این تحقیق نشان داد که ژنوتیپ‌های پرمحصول FLIP 11-86C (۸۸۹/٦ کیلوگرم در هکتار) و FLIP 11-03C (۷۹۵/۷ کیلوگرم در هکتار) که در آزمایش مزرعه‌ای برتر بودند، در شرایط کنترل شده نیز دارای نمره تحمل به سرما برابر با ۳ و شاخص نشت الکترولیت‌ها متوسط بوده و به عنوان ژنوتیپ‌های برتر از نظر تحمل به سرما شناخته شدند.

واژه‌های کلیدی: پایداری غشا، عملکرد دانه، فعالیت آنزیمی، نخود زراعی و نمره تحمل به سرما

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۱۰ این مقاله مستخرج از طرح تحقیقاتی مشترک شماره ۹۸۱۰۱۹-۰۵۳-۱۵۵۱-۵۳-۳ مصوب موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور و دانشگاه پیام نور می‌باشد

۱- دانشیار دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۲- دانشیار مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کردستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، سنندج، ایران
(مکاتبه کننده) (پست الکترونیک:hkanouni@gmail.com)
۳- محقق مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کردستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، سنندج، ایران

مقدمه

دمای محیط، تعیین کننده پراکنش جغرافیایی گیاهان زراعی بوده و بر رشد و نمو آنها اثر مستقیم دارد. گیاهان فقط قادر هستند دماهای کمی بالاتر یا کمی پایین‌تر از حد بهینه برای رشد خود را تحمل نمایند. از بین تنش‌های غیر زیستی، خشکی و سرما شایع‌ترین عوامل تنش در زراعت نخود در نواحی معتدل و سرد مدیترانه‌ای محسوب می‌شوند (Mahajan and Tuteja, 2005).

رتبه‌بندی جهانی نخود نشان می‌دهد که ایران رتبه چهارم از لحاظ سطح زیر کشت، رتبه نهم از نظر میزان تولید و رتبه ۵۳ را از نظر عملکرد در واحد سطح دارا است (FAOSTAT, 2021). کشت نخود در نواحی معتدل و سردسیر معمولاً در بهار و پس از بارندگی‌های فصلی صورت می‌گیرد. در این شرایط گیاه با تنش خشکی انتهای فصل مواجه شده و تا حد زیادی از عملکرد آن کاسته می‌شود. یکی از راه‌های مقابله با این مسئله، کشت نخود در پاییز است. در این‌صورت ژنوتیپ مناسب برای کشت پاییزه باید به سرما و بیماری برق‌زدگی مقاوم باشد. نخود با دارا بودن ۱۹ تا ۲۶ درصد پروتئین خام، نقش مهمی در رژیم غذایی جمعیت رو به رشد کشور ایفا می‌کند (Kanouni, 2020). متوسط عملکرد نخود در کشت بهاره دیم مناطق سرد و معتدل سرد کشور پایین و در حدود ۴۴۰ کیلوگرم در هکتار است (Anonymous, 2022). استان‌های کرمانشاه، لرستان و آذربایجان‌غربی بیشترین سطح زیر کشت نخود سفید (تیپ کابلی) را دارا بوده و استان کردستان قطب تولید نخود سیاه (تیپ دسی) در کشور است (Kanouni, 2020). کشاورزان این استان‌ها نخود را در تناوب با گندم دیم و غالباً به صورت بهاره کشت می‌کنند. در این مناطق کشت بهاره نخود، پس از بارش بخش اعظم نزولات بهاره انجام شده و در چنین شرایطی عملکرد دانه به میزان قابل توجهی تحت تأثیر تنش خشکی انتهای فصل قرار گرفته و از عملکرد آن کاسته می‌شود. تغییر تاریخ کاشت از بهار به پاییز می‌تواند نقش مهمی در افزایش عملکرد نخود در شرایط دیم داشته باشد (Hasanian-Khoshrou, 2021). از طرف دیگر، وقوع تنش سرما ممکن است تا بیش از ۵۰ درصد از عملکرد دانه نخود بکاهد (Abbo *et al*., 2002). با توجه به اهمیت این مسئله، سازوکارهای فیزیولوژیک گیاه نخود نسبت به خسارت تنش سرما مورد مطالعه قرار گرفته است (Amandeep *et al*., 2022; Zeitelhofer *et al*., 2022).

دلایل اصلی پایین بودن عملکرد دانه نخود در کشور استفاده از ارقام محلّی حساس به تنش‌های زیستی و غیر زیستی، عدم رعایت اصول به‌زراعی و اختصاص اراضی دیم و کم بازده به کشت این گیاه است (Kanouni, 2016). بر اساس نتایج بررسی‌های انجام شده، سالیانه حدود ۶/۴ میلیون تن بر اثر تنش‌های غیر زیستی و حدود ۴/۸ میلیون تن در اثر تنش‌های زیستی از عملکرد دانه نخود کاسته می‌شود (Yadav *et al*., 2007). به ترتیب اهمیت، تنش‌های خشکی، دماهای بحرانی، شوری، سمیت ناشی از عناصر و غرقاب شدن مزارع، تنش‌های غیر زنده عمده‌ای هستند که باعث ایجاد خسارت به محصول نخود می‌شوند. سرما در برخی از نواحی غرب آسیا و شمال افریقا اهمیت زیادی داشته و خسارت قابل توجهی به عملکرد نخود وارد می‌سازد. تحقیق در مورد تحمل سرما در نخود از زمانی آغاز شد که مزیت تغییر کاشت آن از بهار به پاییز آشکار شد (Singh *et al*., 1997).

نتایج مقایسه کشت‌های پاییزه و بهاره نخود نشان داده است که در کشت پاییزه، هوادهی و نفوذپذیری خاک کاهش یافته و طغیان علف‌های هرز اتفاق می‌افتد و بروز بیماری‌های قارچی در برخی مناطق و خسارت یخ‌زدگی محتمل هستند. در مقابل فنولوژی مطلوب گیاه با فصل زراعی تطابق یافته، رطوبت خاک بطور مطلوبی ذخیره شده و امکان گریز از خسارت

آفات فراهم می‌شود. در کشت بهاره، هوادهی و نفوذپذیری خاک در اثر عملیات خاک‌ورزی افزایش یافته و کنترل علف‌های هرز به‌خوبی امکان‌پذیر است، ولی از معایب عمده کشت بهاره می‌توان به کاهش عملکرد دانه در اثر تأخیر در کاشت، وقوع تنش خشکی انتهای فصل، افزایش خطر تهاجم و خسارت آفات، وارد شدن خسارت به نظام نوری ۲ فتوسنتزی و کاهش پایداری غشای کلروپلاست که باعث کاهش فتوسنتز می‌شود، اشاره کرد (Toker, 2005).

برای تغییر زمان کاشت از بهار به پاییز، در گام نخست به ارقام متحمل به سرما نیاز است. جستجو در داخل ژرم پلاسم در دسترس با هدف ارزیابی، شناسایی و معرفی ارقام جدید که در برابر تنش سرما عکس‌العمل مطلوب‌تری داشته و ضمن تولید عملکرد دانه بالاتر نسبت به ارقام موجود، از وزن ۱۰۰ دانه و ارتفاع بوته مناسبی برخوردار باشند، به افزایش تولید نخود و بهبود وضعیت معیشتی کشاورزان نخودکار کمک خواهد کرد. به‌علاوه استفاده از خویشاوندان وحشی نیز می‌تواند سهم بالایی در امکان شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به سرما داشته باشد (Mafakheri *et al*., 2020).

نخود به دلیل تنگناهای ژنتیکی و از دست دادن برخی آلل‌های حیاتی در طول دوره تکامل و اهلی شدن، توانایی مقابله با سرماهای سخت را ندارد. با این وجود، آلل‌های تحمل سرمای سخت زمستان و آلل‌های نیاز به بهاره شدن هنوز در اجداد وحشی نخود زراعی مانند *C. reticulatum* Ladiz وجود دارند (Abbo *et al*., 2003). خویشاوندان وحشی نخود به عنوان منبع تحمل به سرما برای دهه‌های متمادی شناخته شده‌اند (Toker, 2005). گزارش شده است که گونه‌های وحشی نخود در مقایسه با ارقام متحمل به سرما، تحمل معنی‌دار بالاتری نسبت به سرما دارند (Yadav *et al*., 2007) (جدول ۱). سینگ و همکاران (Singh *et al*., 1997) گزارش دادند که *C. reticulatum* یکی از گونه‌های یکساله بسیار متحمل به سرما در جنس *Cicer* است. تغییر در نفوذپذیری غشاء باعث نشت آب و مواد محلول به فضای بین سلولی و تبخیر و چروکیدگی سلول شده و به دنبال آن، اثرات دیگری مانند بسته شدن روزنه‌ها و کاهش هدایت هیدرولیکی ریشه‌ها صورت می‌گیرد. در صورت تداوم سرما، نکروزه شدن بافت‌ها و در نهایت مرگ گیاه اتفاق می‌افتد. بر اساس نتایج تحقیق حسنیان خوشرو (Hasanian-Khoshrou, 2021) در تنش سرمای ۴- درجه سانتی‌گراد، ژنوتیپ ILWC109 عملکرد کوانتومی فتوسیستم دو (Fv/Fm) بالاتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها بود و کمتر تحت تأثیر تنش قرار گرفت.

هدف از انجام این تحقیق ارزیابی ژرم پلاسم وحشی و زراعی نخود برای شناسایی لاین‌های جدید متحمل به سرما و شناسایی منابع مقاومت برای انتقال ژن یا ژن‌های تحمل سرما به ارقام زراعی در تحقیقات آتی بوده است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، به منظور شناسایی لاین (های) نخود متحمل به سرما، تعداد ۱۰ ژنوتیپ نخود زراعی تیپ کابلی انتخاب شده از خزانه بین المللی نخود متحمل به سرما (Chickpea International Cold Tolerance Nursery; CICTN-2018) (Kanouni, 2019) همراه با هشت ژنوتیپ نخود وحشی (*Cicer reticulatum*) جمع‌آوری شده از ناحیه جنوب ترکیه و دریافت شده از مرکز ایکاردا، یک لاین شاهد حساس به سرما (ILC533) و یک شاهد متحمل به سرما (رقم سارال) در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار به مدت دو سال زراعی (۱۴۰۰-۱۳۹۸) در ایستگاه سارال کردستان کشت شدند. اسامی و مشخصات لاین‌های نخود در جدول ۲ ارائه شده است. ایستگاه سارال کردستان در طول جغرافیایی ۴۷ درجه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۵ و ارتفاع ۲۲۲۰ متر از سطح دریا قرار

داشته و از یک اقلیم نیمه خشک سرد برخوردار است. متوسط بارندگی بلند مدت این ایستگاه ۵۰۲ میلی‌متر، متوسط درجه حرارت سالیانه آن ۱۰ درجه سانتی‌گراد و تعداد روزهای یخبندان ۱۳۸ روز گزارش شده است. میانگین بارندگی، حداقل و حداکثر دمای ماهانه ایستگاه سارال کردستان در جدول ۳ ارائه شده است.

هر کرت آزمایشی شامل سه ردیف دو متری و فواصل بذور بین و روی ردیف‌ها ۱۰×۳۰ سانتی‌متر بود.

جدول ۱- مشخصات تیپ مطلوب نخود برای تحمل تنش سرما

Table 1. Ideotype chickpea for cold tolerance (Yadav *et al*., 2007)

Physiological traits صفات فیزیولوژیک	Morphological traits صفات مورفولوژیک
پتانسیل آب برگ با تنش کم Leaf water potential with low tension	تیپ روزت در مرحله گیاهچه‌ای Rosette type at seedling stage
محتوای کلروفیل بالا High chlorophyll content	شاخساره سبز تیره Dark green color of foliage
تنظیم اسمزی مناسب Proper osmotic adjustment	تحمل به یخ‌زدگی در مرحله رشد رویشی (تا ۱۵- درجه سانتی‌گراد بدون پوشش برف) Tolerance to freezing at vegetative stage (up to -15 °C) without snow cover
دانه گرده با قدرت زنده‌مانی بالا Pollens with high viability vigor	فوق العاده زودرس برای اجتناب از سرمازدگی Extremely early repining for cold avoidance
ظرفیت باروری بالا High fertility capacity	تحمل سرمازدگی در مرحله گلدهی (تا ۵/۱- درجه سانتی‌گراد) Cold tolerance at flowering stage (up to -5.1 °C)
انتقال مجدد مواد پرورده Remobilization of assimilates	تشکیل دو یا چند گل در هر گره و غلاف‌های چند بذری With two or more flowers in each node and multi-seed bearing pods
محتوای اسید مالیک بالا High malic acid content	-

جدول ۲- اسامی و مشخصات ژنوتیپ‌های نخود مورد ارزیابی

Table 2. Name and characteristics of chickpea genotypes used in the experiment

ردیف No.	ژنوتیپ‌های نخود Chickpea genotype	زراعی/ غیرزراعی Cultivated/ Wild	مشخصات Characteristics	منشاء Origin
1	FLIP 10-374C	Cultivated (C) زراعی	ICARDA Germplasm/ Selected from CICTN-2018	ایکاردا
2	FLIP 11-03C	C	ICARDA Germplasm/ Selected from CICTN-2018	ایکاردا
3	FLIP 11-56C	C	ICARDA Germplasm/ Selected from CICTN-2018	ایکاردا
4	FLIP 11-59C	C	ICARDA Germplasm/ Selected from CICTN-2018	ایکاردا
5	FLIP 11-60C	C	ICARDA Germplasm/ Selected from CICTN-2018	ایکاردا
6	FLIP 11-62C	C	ICARDA Germplasm/ Selected from CICTN-2018	ایکاردا
7	FLIP 11-63C	C	ICARDA Germplasm/ Selected from CICTN-2018	ایکاردا
8	FLIP 11-86C	C	ICARDA Germplasm/ Selected from CICTN-2018	ایکاردا
9	FLIP 11-127C	C	ICARDA Germplasm/ Selected from CICTN-2018	ایکاردا
10	FLIP 11-201C	C	ICARDA Germplasm/ Selected from CICTN-2018	ایکاردا
11	ILWC 135	Wild (W) وحشی	Latitude: 37.55 Longitude: 40.98 (Turkey)	ترکیه
12	ILWC 136	W	Latitude: 37.55 Longitude: 40.98 (Turkey)	ترکیه
13	ILWC 137	W	Latitude: 37.55 Longitude: 40.98 (Turkey)	ترکیه
14	ILWC 138	W	Latitude: 37.55 Longitude: 40.98 (Turkey)	ترکیه
15	ILWC 139	W	Latitude: 37.55 Longitude: 40.98 (Turkey)	ترکیه
16	ILWC 141	W	Latitude: 37.55 Longitude: 40.98 (Turkey)	ترکیه
17	ILWC 182	W	Latitude: 37.57 Longitude: 40.97 (Turkey)	ترکیه
18	ILWC 216	W	Latitude: 37.37 Longitude: 40.80 (Turkey)	ترکیه
19	ILC 533-Sensitive control	شاهد حساس به سرما	Cold Susceptible check (ICARDA)	ایکاردا
20	Saral-Tolerant control	شاهد متحمل به سرما	Cold Tolerant check	ایکاردا

International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA)

صفات گیاهی یادداشت برداری شده در مزرعه شامل تعداد روز تا گلدهی، تعداد روز تا رسیدگی، تعداد غلاف در بوته، تعداد دانه در غلاف، وزن ۱۰۰ دانه و عملکرد دانه بودند. برای ارزیابی تحمل سرما (Cold Tolerance Rate; CTR)، از روش مقیاس‌بندی عددی یک تا نه استفاده شد (Singh *et al.*, 1997). در این روش ژنوتیپ‌های بسیار متحمل بدون هر گونه خسارت با نمره ۱، ژنوتیپ‌های متحمل با خسارت جزئی و ۲۰-۱۱ درصد خسارت با علائم رنگ‌پریدگی برگچه‌ها و عدم از بین رفتن بوته‌ها با عدد ۳، ژنوتیپ‌های متحمل با ۶۰-۴۱ درصد خسارت با علائم رنگ پریدگی برگچه‌ها و خشکی و مرگ ۲۵ درصد از بوته‌ها با عدد ۵، ژنوتیپ‌های حساس با ۸۰- ۶۱ درصد خسارت با علائم رنگ‌پریدگی برگچه‌ها و خشکی و مرگ ۵۰ درصد از بوته‌ها با عدد ۷، و ژنوتیپ‌های بسیار حساس با مرگ ۱۰۰ درصد بوته‌ها با عدد ۹ مشخص می‌شوند. اعداد ۲، ۴، ۶ و ۸ نیز به عنوان حد واسط در نظر گرفته می‌شوند.

ژنوتیپ‌های نخود علاوه بر مزرعه به‌صورت گلدانی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در اطاقک سرما در دانشگاه پیام نور مهاباد کشت شدند. ترکیب خاک گلدان‌ها یک سوم کود آلی و دو سوم خاک مزرعه با بستر لومی رسی بود. گلدان‌ها در شرایط کنترل شده و کاهش تدریجی دما قرار داده شدند. دمای اطاقک سرما با گیاهچه‌های دو برگی در دمای ثابت شب و روز ۲۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد و در هفته اول دمای آن هر روز ۳ درجه سانتی‌گراد کاهش داده شد. پس از چهار برگی شدن بوته‌ها، به مدت دو هفته در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و صفات پایداری غشای سلولی، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز، محتوای کلروفیل a ، b و کل، میزان نشت الکترولیت‌ها و محتوای آب نسبی برگ اندازه‌گیری و ثبت شدند. در مرحله نهایی گیاهچه‌های سازش یافته همراه با شاهدهای حساس و متحمل به سرما به مدت دو ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و مقدار دمای آستانه برای از بین رفتن ۵۰ درصد بوته‌ها (Semi-lethal temperature; LT_{50}) برای هر ژنوتیپ مشخص شد (Fowler *et al.*, 1981). محتوای آب نسبی برگ (RWC) با استفاده از روش ریچی و همکاران (Ritchie *et al.*, 1990) اندازه‌گیری شد.

جدول ۳- اطلاعات هواشناسی ایستگاه تحقیقات کشاورزی سارال (۱۴۰۰-۱۳۹۸)

Table 3. Meteorological information of Saral experiment station (2019-2021)

		۱۳۹۹-۱۳۹۸ 2019-220			۱۴۰۰-۱۳۹۹ 2020-2021		
Months	ماه	دمای حداقل Min. Temp. (˚C)	دمای حداکثر Max. Temp. (˚C)	بارندگی Precipitation (mm)	دمای حداقل Min. Temp. (˚C)	دمای حداکثر Max. Temp. (˚C)	بارندگی Precipitation (mm)
Oct.	اکتبر	1.4	29.1	13.4	7.6	21.3	0
Nov.	نوامبر	-9.1	17.7	26.3	3.7	16.0	53.5
Dec.	دسامبر	-13.5	13.5	80.1	-1.7	4.2	31.5
Jan.	ژانویه	-12.5	10.3	26.1	-3.4	6.5	7.0
Feb.	فوریه	-18.1	12.7	23.4	-3.2	6.4	52
Mar.	مارس	-7.8	18.3	99.3	-0.6	8.6	17
Apr.	آوریل	-3.7	19.4	47.3	1.1	12.3	15.8
May	می	-1.6	27.0	79.4	8.1	22.0	4.0
Jun.	ژوئن	3.4	32.5	0	12.3	28.3	0
Jul.	ژوییه	11.2	33.6	0	14.3	27.7	0
Aug.	اوت	16.3	37.5	0	19.8	29.2	0
Sep.	سپتامبر	14.7	31.1	0	18.4	27.4	1.9

Total precipitation in 2019-2020: 395.6 mm
Total precipitation of 2020-2021: 182.7 mm

مجموع نزولات سال ۱۳۹۹: ۳۹۵/۶ میلی‌متر
مجموع نزولات سال ۱۴۰۰: ۱۸۲/۷ میلی‌متر

برای اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت‌ها ۲۴ ساعت پس از قرار دادن گیاهچه‌ها در معرض تنش سرما، برگ چهارم (آخرین برگ توسعه یافته) جدا شده و در بشر حاوی آب دوبار تقطیر قرار داده شده و هدایت الکتریکی آن با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری هدایت الکتریکی (EC متر) اندازه‌گیری شد (EC_1). پس از ۲۴ ساعت، مجدداً هدایت الکتریکی محلول اندازه‌گیری (EC_2) و نشت الکترولیت‌ها با استفاده از رابطه یک به‌دست آمد (Hepburn *et al.*, 1986).

$$EL\% = \frac{EC_1}{EC_2} \times)100$$ (رابطه ۱)

برای تعیین میزان کلروفیل، میزان جذب محلول استون حاوی کلروفیل در طول موج‌های ۶۴۵ نانومتر (برای کلروفیل a) و۶۶۳ نانومتر (برای کلروفیل b) در دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شدند. محتوای کلروفیل a، b و کلروفیل کل با استفاده از روابط زیر بدست آمدند (Ashraf *et al.*, 1994):

(رابطه ۲) (W ×۱۰۰۰) V ((جذب در ۱۴۵ نانومتر) ۲/۶۹ – (جذب در ۶۳۳ نانومتر) ۱۲/۷) = میلی‌گرم کلروفیل a بر گرم وزن تر

(رابطه ۳) (W ×۱۰۰۰) V ((جذب در ۶۶۳ نانومتر) ۴/۶۹ – (جذب در ۶۴۵ نانومتر) ۲۲/۹) = میلی‌گرم کلروفیل b بر گرم وزن تر

(رابطه ۴) (W ×۱۰۰۰) V ((جذب در ۶۶۳ نانومتر) ۸/۰۲ – (جذب در ۶۴۵ نانومتر) ۲۰/۲) = میلی‌گرم کلروفیل a و b بر گرم وزن تر

V: حجم نهایی نمونه استخراج شده و W: وزن تر نمونه هستند.

برای تعیین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز از روش چانس و ماهلی استفاده شد (Chance and Maehly, 1955).

(رابطه ۵) $$\text{فعالیت آنزیم کاتالاز} = \frac{\Delta A}{39.4} \times 100$$

برای تعیین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز از روش چانس و ماهلی (۱۹۵۵) استفاده شده و پس از آن فعالیت پراکسیداز براساس میزان اکسید شدن گایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از رابطه زیر تعیین شد (Chance and Maehly, 1955).

(رابطه ۶) $$\text{فعالیت آنزیم پراکسیداز} = \frac{\Delta A}{0.01} \times 100$$

ΔA: اختلاف بیشترین و کمترین میزان جذب است.

برای اندازه‌گیری شاخص پایداری غشاء، هدایت نهایی آب حاوی نمونه‌ها اندازه‌گیری و میزان خسارت با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (Blum and Ebercon, 1981).

(رابطه ۷) $$\text{میزان خسارت غشای سلولی (\%)} = 1-(1-\frac{\frac{T_1}{T_2}}{1}\frac{C_1}{C_2})\times 100$$

T و C: به‌ترتیب هدایت الکتریکی در تیمار تنش و شاهد بوده و اندیس‌های ۱و ۲ به ترتیب نشان دهنده هدایت الکتریکی اولیه و نهایی هستند. محتوای پرولین با استفاده از روش بیتس و همکاران (Bates *et al.*, 1973) اندازه‌گیری شد.

تجزیه واریانس، مقایسه میانگین‌ها، همبستگی بین صفات، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم‌افزارهای STATGRAPHICS Centurion 17.2 و SAS انجام شدند.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس آزمایش گلدانی نشان داد که ژنوتیپ‌های نخود از نظر پایداری غشاء، محتوای پرولین، محتوای آب نسبی برگ، فعالیت آنزیم کاتالاز، نشت الکترولیت‌ها، دمای آستانه برای از بین رفتن ۵۰ درصد بوته‌ها (LT_{50})، محتوای کلروفیل b و کلروفیل کل در سطح احتمال پنج درصد و از نظر فعالیت آنزیم پراکسیداز، نمره تحمل سرما و محتوای کلروفیل a در

سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری داشتند. نتایج مقایسات گروهی برای ژنوتیپ‌های زراعی، ژنوتیپ‌های وحشی و زراعی در برابر وحشی نشان داد که در ژنوتیپ‌های زراعی از لحاظ فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز، پایداری غشاء، نشت الکترولیت‌ها و محتوای کلروفیل a در سطح احتمال یک درصد و از نظر میزان پرولین، LT_{50}، محتوای کلروفیل b و کلروفیل کل در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری وجود داشت. در ژنوتیپ‌های وحشی فقط از نظر محتوای آب نسبی برگ و نشت الکترولیت‌ها تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت. بین ژنوتیپ‌های زراعی و وحشی از نظر LT_{50} و کلروفیل کل در سطح احتمال پنج درصد و از لحاظ نشت الکترولیت‌ها در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری وجود داشت. نتایج تجزیه واریانس مرکب صفات زراعی طی دو سال زراعی ۹۹-۱۳۹۸ و ۱۴۰۰-۱۳۹۹ نشان داد که تفاوت بین ژنوتیپ‌های نخود از لحاظ ارتفاع بوته، تعداد غلاف در بوته، وزن ۱۰۰ دانه و عملکرد دانه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. برهمکنش سال در ژنوتیپ فقط برای ارتفاع بوته در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. به نظر می‌رسد که اختلاف بیش از ۲۰۰ میلی‌متر بارندگی در دو سال اجرای آزمایش (جدول ۳) از دلایل اصلی این تفاوت بوده است.

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در آزمایش مزرعه‌ای ژنوتیپ‌های نخود برای صفات تعداد روز از کاشت تا ۵۰ گلدهی و رسیدگی کمترین میزان تنوع را داشتند. برای تعداد روز از کاشت تا ۵۰ درصد گلدهی، ژنوتیپ‌های ۸ و ۱۲ با دو روز اختلاف به ترتیب کمترین و بیشترین تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی را داشتند. ژنوتیپ‌های ۱۷ و ۱۰ با پنج روز اختلاف به‌ترتیب کمترین و بیشترین تعداد روز تا رسیدگی را داشتند. از لحاظ ارتفاع بوته، ژنوتیپ ۶ (۳۲/۳ سانتی‌متر) بیشترین و ژنوتیپ ۱۶ (۱۹/۴ سانتی‌متر) کمترین ارتفاع بوته را داشتند. بین ژنوتیپ‌های نخود از نظر تعداد غلاف در بوته تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای وجود داشت (جدول ۴). رقم سارال بیشترین (۳۴/۷) و ژنوتیپ شماره ۱۸ کمترین (۱۲/۵) تعداد غلاف در بوته را داشتند. از نظر تعداد دانه در غلاف، تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های نخود وجود نداشت. برای وزن صد دانه نیز تنوع قابل ملاحظه‌ای بین ژنوتیپ‌های نخود وجود داشت (جدول ۴). ژنوتیپ‌های ۳ بیشترین (۴۰/۵ گرم) و ۱۳ کمترین (۲۳/۹ گرم) وزن صد دانه را داشتند. از لحاظ عملکرد دانه، ژنوتیپ‌های زراعی آشکارا عملکرد بالاتری نسبت به ژنوتیپ‌های وحشی داشتند. علی‌رغم این‌موضوع، ژنوتیپ‌های کم محصول مانند ژنوتیپ شماره ۳ (FLIP 11-56C) با عملکرد ۲۸۰/۴ کیلوگرم در هکتار و ژنوتیپ‌های پر محصول مانند ژنوتیپ ۸ (FLIP 11-86C) با عملکرد ۸۸۹/۶ کیلوگرم در هکتار و ژنوتیپ ۲ (FLIP 11-03C) با عملکرد ۷۹۵/۷ کیلوگرم در هکتار، متعلق به ژنوتیپ‌های زراعی بودند.

نتایج نشان داد که بین ژنوتیپ‌های نخود از لحاظ کلیه صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی تنوع وجود داشت. کمترین و بیشترین میزان پایداری غشاء به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های ۳ و ۱ بود. از لحاظ محتوای پرولین، ژنوتیپ ۲ دارای بیشترین (۳۰/۵ میکرومول بر گرم وزن تر) و شاهد حساس به سرما (ILC 553) دارای کمترین (۲۰/۵ میکرومول بر گرم وزن تر) مقدار بودند. از لحاظ فعالیت آنزیم پراکسیداز، نتیجه برعکس بود و ژنوتیپ‌های ۲ (۱۸/۰ میلی‌گرم بر گرم) و ۱۹ (۳۱/۱ میلی‌گرم بر گرم) به‌ترتیب کمترین و بیشترین مقدار فعالیت پراکسیداز را داشتند. کمترین و بیشترین محتوی آب نسبی برگ به‌ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های ۱۶ (۴۷ درصد) و ۱۲ (۶۹ درصد) بودند. کمترین و بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز به‌ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های ۹ (۱۱/۷ میلی‌گرم برگرم) و ۷ (۱۸/۰ میلی‌گرم برگرم) بودند. از لحاظ نمره تحمل سرما ژنوتیپ وحشی ۱۱ بیشترین و ژنوتیپ ۵ کمترین تحمل سرما را داشتند (جدول ۴).

در رابطه با نشت الکترولیت‌ها، ژنوتیپ‌های ۳ و ۲ به‌ترتیب کمترین (۴۷/۳ کمترین) و بیشترین (۸۹/۶ درصد) میزان نشت الکترولیت‌ها را داشتند. پایین

بودن میزان نشت الکترولیت‌ها نشان‌دهنده تحمل بالاتر ژنوتیپ به تنش سرما است (Arslan *et al*., 2018). نتایج نشان داد که ژنوتیپ ۳ (FLIP 11-56C) دارای تحمل سرما مطلوب و نشت الکترولیتی پایین (۴۷/۳ درصد) بود که نشان دهنده تحمل بالای این ژنوتیپ به تنش سرما بود. مقدار دمایی که در آن پنجاه درصد بوته‌ها بر اثر سرما از بین می‌روند، (LT_{50}) برای ژنوتیپ ۲ بالاترین مقدار (۴/۷۰- درجه سانتی‌گراد) و برای ژنوتیپ ۱۸ پایین‌ترین مقدار (۱۸/۹۰- درجه سانتی‌گراد) بود. در مورد محتوای کلروفیلa، کمترین مقدار در ژنوتیپ ۶ (۷/۸ میلی‌گرم) و بیشترین مقدار در ژنوتیپ ۸ (۱۱/۹میلی‌گرم) به دست آمد. محتوای کلروفیلb، در محدوده ۴/۳-۶/۲ میلی‌گرم قرار داشت و کمترین مقدار آن در ژنوتیپ ۱۲ و بیشترین مقدار آن در ژنوتیپ ۸ مشاهده شد. میزان کلروفیل کل نیز در محدوده ۱۴/۶ میلی‌گرم (ژنوتیپ ۱۵) تا ۱۶/۸ میلی‌گرم (ژنوتیپ ۱۲) قرار داشت (جدول ۴). بر اساس نتایج تحقیقات قبلی محتوای کلروفیل a و b به شرایط تنش‌های غیرزیستی حساس بوده و در تنش سرما کاهش می‌یابند (Amini *et al*., 2021; Abdollahi Hesar *et al*., 2022).

نتایج تجزیه همبستگی نشان داد که وزن ۱۰۰ دانه با تعداد دانه در غلاف همبستگی منفی و معنی‌داری داشت. رابطه بین تعداد دانه در غلاف و نمره تحمل سرما منفی و معنی‌دار بود. رابطه تعداد غلاف در بوته با تعداد روز تا گلدهی مثبت و معنی دار و ارتفاع بوته با تعداد روز از کاشت تا رسیدگی مثبت و معنی‌دار بود. کلروفیل a با کلروفیلb و کلروفیل کل همبستگی مثبت و معنی‌داری داشت. رابطه بین کلروفیلa و نشت الکترولیتی نیز مثبت و معنی‌دار، ولی همبستگی آن با فعالیت آنزیم کاتالاز منفی و معنی‌دار بود. این موضوع در تحقیق مشابهی گزارش شده است (Croser *et al*., 2003). همبستگی کلروفیلb با کلروفیل کل و نشت الکترولیت‌ها مثبت و معنی‌دار و همبستگی آن با فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و تحمل سرما منفی و معنی‌دار بود. رابطه کلروفیل کل با ارتفاع بوته منفی و معنی‌دار و با تعداد دانه در غلاف مثبت و معنی‌دار بود (جدول ۵).

بر اساس نتایج تجزیه همبستگی، بین میزان پرولین و تعداد روز تا گلدهی رابطه مثبت و معنی‌داری وجود داشت. همبستگی مثبت بین محتوای پرولین و تعداد روز تا گلدهی در سایر تحقیقات نیز گزارش شده است (Tarinejad *et al*., 2020; Zeitelhofer *et al*., 2022). همبستگی بین LT_{50} و فعالیت آنزیم پراکسیداز منفی و معنی‌دار و همبستگی بین پایداری غشاء و تعداد غلاف در بوته منفی و معنی‌دار بود (جدول ۵).
عملکرد دانه با تعداد روز از کاشت تا گلدهی و فعالیت آنزیم پراکسیداز همبستگی منفی و معنی‌دار داشت. رابطه منفی بین عملکرد دانه و تعداد روز تا گلدهی در سایر تحقیقات نیز گزارش شده است (Yadav *et al*., 2007; Singh *et al*., Rakei *et al*., 2016; 1997). به‌علاوه عملکرد دانه با LT_{50} در سطح احتمال پنج درصد و با وزن ۱۰۰ دانه در سطح احتمال یک درصد همبستگی معنی‌داری داشت، بنابراین در گزینش ژنوتیپ‌های نخود متحمل به سرما می‌توان شاخص LT_{50} و فعالیت آنزیم پراکسیداز را مورد توجه قرار داد. نتایج تحقیقات نشان داده است که فعالیت آنزیمی در ارقام متحمل به سرما بیشتر است (Rakei *et al*., 2016; Yadav *et al*., 2007). بنا به گزارش مانتری و همکاران (Mantri *et al*., 2007) آنزیم کاتالاز نقش مهمی در تحمل سرما در گیاهان دارد. نتایج آزمایش آنان روی دو رقم نخود متحمل و حساس به سرما نشان داد که بعد از تنش سرما، فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم متحمل بیشتر از رقم حساس بود. براساس نتایج آزمایش حاضر به‌نظر می‌رسد که در شرایط مزرعه می‌توان از زودرسی (تعداد روز تا گلدهی) و وزن ۱۰۰ دانه جهت افزایش عملکرد دانه استفاده کرد. به‌علاوه فعالیت آنزیم پراکسیداز، نشت الکترولیت و محتوای کلروفیلb نیز سهم قابل توجهی در تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های نخود مورد بررسی داشتند (جدول ۴).

جدول ۴- مقایسه میانگین صفات و شاخص‌های گیاهی ژنوتیپ‌های زراعی و وحشی نخود در تیمار تنش سرما

Table 4. Mean comparison of plant traits and indices of cultivated and wild chickpea genotypes in cold stress treatment

ژنوتیپ‌های نخود Chickpea genotypes	عملکرد دانه Seed yield (kg.ha^{-1})	وزن ۱۰۰ دانه 100 Seed weight (g)	غلاف در بوته Pod.plant^{-1}	ارتفاع بوته Plant ht. (cm)	کلروفیل کل Total chl. (mg.g^{-1} FW)	کلروفیلb Chl.b (mg.g^{-1} FW)	کلروفیلa Chl.a (mg.g^{-1} FW)	LT_{50} (°C)	نشت الکترولیت ELI (%)	نمره تحمل سرما CTR	کاتالاز CATL (mg/g)	محتوای آب نسبی RWC (%)	پراکسیداز PROX (mg/g)	پرولین Proline (µmol g^{-1} FW)	پایداری غشاء Membrane stability Index (%)
1	639.2	34.8	13.6	20.3	14.8	4.9	9.6	-13.8	72.1	3.0	14.6	50.0	29.7	26.5	68.0
2	795.7	36.7	15.0	22.9	16.6	5.8	12.0	-4.7	89.6	3.3	13.8	62.6	18.0	30.5	43.2
3	280.4	40.5	14.9	22.7	15.4	4.7	10.6	-15.8	47.3	3.0	15.1	56.6	28.3	22.8	18.4
4	729.2	37.2	15.9	23.7	14.7	5.2	10.4	-13.3	69.4	3.3	15.3	53.6	27.3	27.3	59.6
5	507.7	33.5	15.5	26.3	14.8	4.5	10.3	-10.2	64.4	8.3	11.9	58.0	22.7	20.9	71.1
6	632.9	40.0	13.4	32.3	13.7	5.2	7.8	-12.4	50.6	3.0	14.7	57.6	24.8	24.3	59.3
7	777.2	36.5	16.0	20.4	15.0	4.4	9.9	-17.0	67.6	4.0	18.0	61.0	22.5	25.2	64.5
8	889.6	38.5	14.0	22.7	16.8	6.2	11.9	-11.9	66.7	3.0	12.0	59.3	23.3	20.4	49.8
9	746.9	39.0	15.1	23.0	16.0	5.4	10.6	-12.7	81.6	5.3	11.7	69.3	24.7	25.5	39.0
10	459.5	35.5	13.6	22.9	15.2	4.6	10.5	-13.6	76.1	6.6	15.0	54.0	27.0	25.1	61.2
11	490.9	25.0	14.6	24.8	15.5	4.8	10.6	-14.0	87.3	1.6	16.0	51.6	29.7	27.8	62.6
12	440.2	24.1	14.9	21.2	16.8	4.3	10.1	-13.5	48.0	3.3	15.0	69.0	28.3	27.9	52.1
13	448.4	23.9	14.0	23.1	15.9	5.0	10.8	-14.3	77.4	2.3	14.5	63.3	28.7	25.8	57.9
14	519.1	26.8	13.6	26.5	15.9	5.3	11.1	-18.7	54.2	4.0	14.5	65.6	26.4	26.4	66.6
15	537.9	25.2	14.3	20.1	14.6	4.4	10.2	-12.4	75.2	8.3	14.8	58.3	25.8	29.6	34.2
16	529.3	25.7	12.7	19.4	16.2	5.9	10.2	-13.4	64.6	3.6	15.0	47.0	21.8	24.5	46.1
17	299.1	24.7	14.8	21.6	16.4	5.6	11.1	-16.7	87.5	2.3	14.0	63.3	24.1	22.1	52.6
18	482.2	25.5	12.5	24.2	16.4	6.0	11.0	-18.9	76.3	2.0	13.3	49.0	24.3	26.0	29.4
19	478.6	36.9	14.2	21.7	15.2	4.3	9.6	-15.2	63.9	3.0	15.1	68.6	31.1	20.5	49.5
20	529.3	33.9	34.7	21.4	15.8	5.2	10.5	-11.0	76.7	3.3	15.1	62.3	26.5	29.6	30.2
$LSD_{5\%}$	253.8	5.3	2.7	3.7	1.6	1.18	1.58	-6.2	25.1	2.4	2.8	13.1	5.2	5.8	27.7
Min	68.7	20.1	9.4	11.3	13.2	2.75	6.61	-19.5	41.3	1.0	11.0	41.0	17.4	17.8	16.4
Max	1400	52.3	37.4	35.0	18.0	6.9	12.2	12.2	96.5	9.0	18.9	73.0	32.8	32.6	91.9
Mean±SE	562±25.8	32.19±0.69	15.3±0.46	23.09±0.43	15.6±0.15	5.1±0.11	10.4±0.15	-13.7± 0.56	70.6± 2.3	3.8± 0.29	14.52±0.26	59.03±1.25	25.7± 0.53	25.4±0.53	51.7±2.48
CV (%)	50.3	23.7	32.9	20.5	18.0	16.3	11.3	31.8	24.9	57.9	13.6	16.3	16.0	16.0	37.1

جدول ۵- ضرایب همبستگی بین صفات و شاخص‌های گیاهی ژنوتیپ‌های زراعی و وحشی نخود در تیمار تنش سرما

Table 5. Correlation coefficients between plant traits and indices of cultivated and wild chickpea genotypes in cold stress treatment

صفات و شاخص‌های گیاهی Plant traits/ indices	CLPA	CLPB	CLPT	CATL	CTR	DF	DM	ELI	LT_{50}	MSI	PHT	PPP	PROX	PROL	RWC	SPP	SW
CLPB	0.488*																
CLPT	0.763**	0.516*															
CATL	-0.362*	-0.459*	-0.329														
CTR	-0.079	-0.401*	-0.354	-0.241													
DF	-0.052	-0.199	0.116	0.245	-0.088												
DM	-0.282	-0.033	-0.287	0.276	-0.096	0.034											
ELI	0.544**	0.396*	0.319	-0.239	-0.061	-0.139	-0.170										
LT_{50}	0.136	0.083	0.006	-0.302	0.284	0.092	0.093	0.297									
MSI	-0.211	-0.131	-0.257	0.081	0.028	-0.126	0.108	0.006	-0.171								
PHT	-0.328	0.102	-0.393*	-0.223	-0.047	-0.197	0.460*	-0.276	0.025	0.333							
PPP	0.040	-0.046	0.024	0.119	-0.021	0.463*	-0.013	0.119	0.252	-0.364*	-0.154						
PROX	-0.335	-0.537**	-0.259	0.296	-0.212	0.214	0.136	-0.266	-0.429*	0.055	-0.047	0.039					
PROL	0.109	-0.028	0.029	0.307	0.002	0.454*	0.205	0.216	0.296	-0.161	-0.149	0.332	-0.048				
RWC	0.113	-0.264	0.255	-0.143	0.061	-0.005	-0.342	-0.095	0.082	-0.150	0.007	0.201	0.061	-0.049			
SPP	0.219	0.298	0.488*	-0.077	-0.441*	-0.275	0.013	0.251	-0.195	-0.099	-0.093	0.234	0.217	0.285	0.281		
SW	-0.201	-0.019	-0.357	-0.109	0.091	-0.239	0.037	-0.143	0.328	-0.159	0.222	0.129	-0.118	-0.278	0.086	-0.484*	
YLD	0.101	0.302	-0.038	-0.164	0.073	-0.387*	-0.077	0.284	0.438*	0.189	0.041	-0.006	-0.453*	0.145	0.017	-0.037	0.496**

* و **: به‌ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد

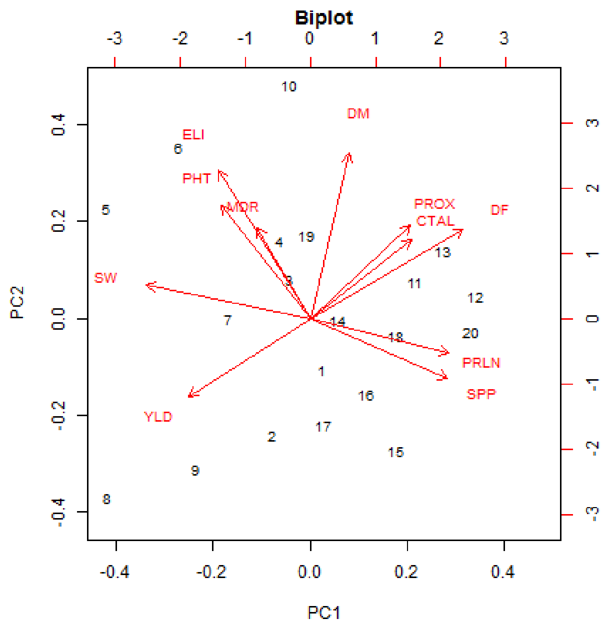
* and **: Significant at 5 and 1% percent probability levels, respectively

CLPA: کلروفیل a، CLPB: کلروفیل b، CLPT: کلروفیل کل، CTAL: کاتالاز، CTR: نمره تحمل سرما، DF: روز از کاشت تا گلدهی، DM: روز از کاشت تا رسیدگی، ELI: نشت الکترولیت، LT_{50}: دمای آستانه از بین رفتن ۵۰ درصد بوته‌ها، MSI: پایداری غشاء، PHT: ارتفاع بوته، PPP: تعداد غلاف در بوته، PROX: پراکسیداز، PROL: پرولین، RWC: محتوی آب نسبی برگ، SPP : تعداد دانه در غلاف، SW: وزن ۱۰۰ دانه، YLD: عملکرد دانه

CLPA: Chlorophyll a, CLPB: Chlorophyll b, CLPT: Total chlorophyll, CATL: Catalase, CTR: Cold tolerance rate, DF: Days to flowering, DM: Days to maturity, ELI: Electrolyte leakage index, LT_{50}: 50% Lethal temperature, MSI: Membrane stability index, PHT: Plant height, PPP: Pod.plant^{-1}, PROX: Peroxidase, PROL: Proline, RWC: Relative water content, SPP: Seed.pod^{-1}, SW: 100 Seed weight, YLD: Seed yield

ژنوتیپ ۳ (FLIP 11-56C) با دارا بودن نمـره تحمـل سرما برابر با ۳ و LT_{50} حدود ۱۶- درجه سانتی‌گـراد، از خصوصیات مناسبی به‌عنوان ژنوتیپ متحمل بـه سـرما و یخبندان برخوردار بود، ولی عملکرد دانه آن پـایین بـود (جدول ۴). بنابراین از این ژنوتیپ می‌توان به عنوان منبع تحمل به تنش سـرما در تحقیقـات آینـده اسـتفاده کـرد. ژنوتیپ‌های پرمحصول FLIP 11-86C (با عملکرد دانـه ۸۸۹/۶ کیلوگرم در هکتار) و FLIP 11-03C (با عملکرد دانه ۷۹۵/۷ کیلوگرم در هکتار) دارای نمره تحمل سرما برابر با ۳ و نشت الکترولیتـی متوسـط بودنـد و بـه‌عنـوان ژنوتیپ‌های برتر در این تحقیق شناخته شدند.

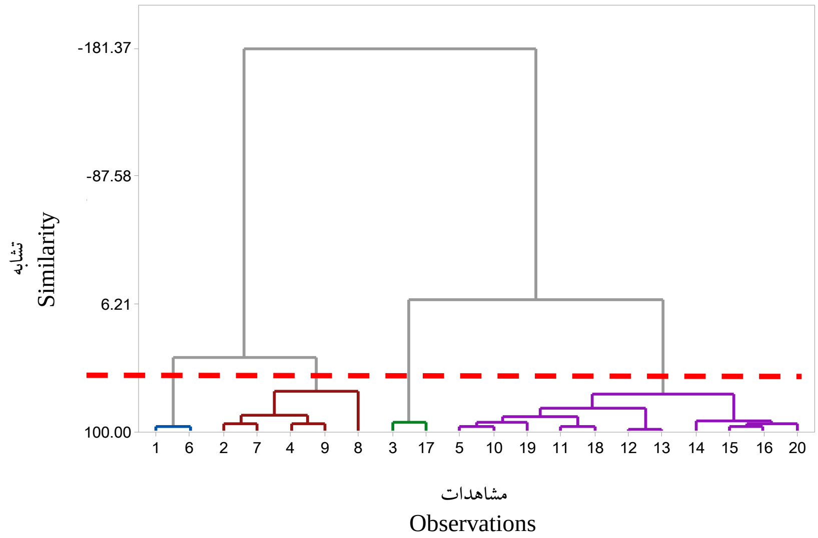
نمودار بای‌پـلات روابـط بـین ژنوتیـپ‌هـا بـا متغیرهـای آزمایش را در یک شکل واحد نشان می‌دهـد. بـرای ایـن‌کار، ابتدا ماتریس داده‌های جدول ۴ بـه مؤلفـه‌هـای اصـلی آن تجزیه شد. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد کـه دو مؤلفـه اصـلی اول و دوم حـدود ۴۸ درصـد از تغییـرات داده‌ها را توجیه کردند، بنابراین ترسیم بای‌پلات بـر اسـاس این دو مؤلفه که نسبت بـه هـم حالـت اورتوگونـال دارنـد (مستقل از هم هستند) انجام شد. به‌عـلاوه مـی‌تـوان مقـادیر وزنی هر کدام از متغیرها در مؤلفه‌های اصلی را بـه‌صـورت ضرایب همبستگی نیز روی نمـودار نشـان داد. اولـین مؤلفـه اصلی ۲۷/۲۳ درصد از کـل واریـانس را در بـر گرفتـه و بـا مقـادیر فعالیـت آنـزیم کاتـالاز، پـرولین، فعالیـت آنـزیم پراکسیداز و همچنین با تعداد روز تا گلـدهی و تعـداد دانـه در غلاف همبستگی مثبت و بـالایی داشـت. ایـن مؤلفـه بـا نشت الکترولیـت‌هـا و پایـداری غشـاء از یـک طـرف و بـا عملکرد دانـه و وزن ۱۰۰ دانـه از طـرف دیگـر، همبسـتگی منفی داشت، بنابراین از این مولفه مـی‌تـوان بـرای تفکیـک ژنوتیپ‌های پرمحصول از ژنوتیـپ‌هـای بـا عملکـرد پـایین استفاده کرد. دومین مؤلفه اصلی، ۲۰/۶۲درصد از تغییـرات ماتریس داده‌ها توجیه کـرده و بـا تعـداد روز از کاشـت تـا رسـیدگی همبسـتگی مثبـت داشـت. سـمت و زاویـه بـین خطوط مربوط به هر متغیر، همبستگی بین آنها را نشـان داده و طول خطوط، انحراف معیار هر کـدام از متغیرهـا را نشـان می‌دهد. این بای‌پلات نشـان مـی‌دهـد کـه ژنوتیـپ‌هـای ۹ (FLIP 11-127C)، ۲ (FLIP 11-03C)، ۸ (FLIP 11-86C) و ۷ (FLIP 11-63C) عملکرد بالایی در شرایط تـنش سـرما در کشت پاییزه داشتند (شکل ۱).



شکل ۱- بای‌پلات صفات و شاخص‌های گیاهی ژنوتیپ‌های نخود بر مبنای مؤلفه‌های اصلی اول و دوم

Fig. 1. Biplot of plant traits and indices of chickpea genotypes based on first and second principle components

به‌منظور گروه‌بندی ژنوتیپ‌های نخود مورد مطالعه از تجزیه خوشه‌ای به روش Ward و فاصله اقلیدسی استفاده شد (شکل ۲). بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای برای کلیه صفات و شاخص‌های گیاهی، ژنوتیپ‌های نخود در سه گروه دسته‌بندی شدند. خوشه اول شامل ژنوتیپ‌های ۱، ۲، ۴، ۶، ۷، ۸ و ۹ بود. این ژنوتیپ‌ها همگی جزء لاین‌های زراعی بوده و در اغلب صفات، بویژه در عملکرد دانه، دارای ارزشی بالاتر از میانگین کل بودند. در خوشه دوم، ژنوتیپ‌های ۳ و ۱۷ قرار گرفتند که علی‌رغم دارا بودن ویژگی تحمل سرما (CTR برابر ۳ و کمتر) کمترین میزان عملکرد دانه را داشتند. سایر ژنوتیپ‌ها اعم از وحشی و زراعی در خوشه سوم قرار گرفتند. در این خوشه برای صفات مربوط به وزن ۱۰۰ دانه، نشت الکترولیت‌ها و محتوای پرولین ارزشی بالاتر از میانگین کل مشاهده شد.



شکل ۲- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای صفات و شاخص‌های گیاهی ژنوتیپ‌های نخود بر اساس روش وارد و معیار فاصله اقلیدسی

Fig. 2. Dendrogram of cluster analysis for plant traits and indices of chickpea genotypes based on Ward's method and Euclidean distance

نتایج تجزیه رگرسیونی صفات و شاخص‌های گیاهی ژنوتیپ‌های نخود به روش رگرسیون نزولی نشان داد که پایداری غشاء، محتوای پرولین، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز، نشت الکترولیت‌ها، تعداد روز از کاشت تا گلدهی، تعداد روز از کاشت تا رسیدگی، ارتفاع بوته، تعداد دانه در غلاف، و وزن ۱۰۰ دانه، در مدل رگرسیونی باقی ماندند. ضریب تبیین تصحیح شده (۹۱/۰۸) نشان داد که این صفات حدود ۹۲ درصد از تغییرات عملکرد دانه را توجیه کردند (جدول ۶).

به‌منظور تعیین دقیق‌تر سهم هر یک از صفات باقی مانده در مدل، با استفاده از تجزیه ضرایب همبستگی، اثرات مستقیم و غیرمستقیم صفات بر عملکرد دانه برآورد شدند. از بین صفات یاد شده، بیشترین اثر مستقیم و مثبت صفات بر عملکرد دانه مربوط به وزن ۱۰۰ دانه و پس از آن پایداری غشاء و فعالیت آنزیم پراکسیداز بودند (جدول ۷).

جدول ۶- ضرایب رگرسیون و ضرایب رگرسیون ناقص استاندارد شده صفات و شاخص‌های گیاهی ژنوتیپ‌های نخود به روش نزولی

Table 6. Regression coefficients and standardized partial regression coefficients for plant traits and indices of chickpea genotype using backward elimination

Traits/ indices remain in the model	صفات و شاخص‌های باقیمانده در مدل	ضریب رگرسیون Regression coefficient	ضریب رگرسیون ناقص استاندارد شده Standardized partial regression coefficient	سطح احتمال Probability
Membrane stability index	پایداری غشاء	7.045	0.601	0.0001
Proline	پرولین	31.339	0.582	0.0001
Peroxidase	فعالیت پراکسیداز	-19.146	-0.382	0.001
Catalase	فعالیت کاتالاز	-25.603	-0.232	0.035
Electrolyte leakage index	نشت الکترولیت	-2.661	-0.211	0.039
Days to flowering	روز تا گلدهی	-172.604	-0.563	0.0001
Days to maturity	روز تا رسیدگی	30.043	0.243	0.038
Plant height	ارتفاع بوته	-31.331	-0.567	0.001
Seed.pod^{-1}	دانه در غلاف	3147.057	0.487	0.0001
100 Seed weight	وزن ۱۰۰ دانه	22.138	0.487	0.0001
Intercept	عرض از مبداء	26742.597	-	0.001

بیشترین اثر مستقیم منفی مربوط به تعداد روز از کاشت تا گلدهی بود. در شرایط دیم این صفت معمولا با عملکرد دانه ارتباط نزدیکی دارد (Sharma and Lavanya, 2002). اثرات باقیمانده در تجزیه علیت زیاد نبود (۰/۱۴۸) و نشان داد که پایداری غشاء، محتوای پرولین، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز، نشت الکترولیت‌ها، تعداد روز تا گلدهی، تعداد رو ز تا رسیدگی، ارتفاع بوته ، تعداد غلاف در بوته و وزن ۱۰۰ دانه، حدود ۹۱ درصد از تغییرات مربوط به عملکرد دانه را تبیین کردند.

جدول ۷- تجزیه ضرایب همبستگی به اثرات مستقیم و غیر مستقیم صفات و شاخص‌های گیاهی بر عملکرد دانه ژنوتیپ‌های نخود

Table 7. Correlation coefficients analysis to direct and indirect effects of plant traits and indices of chickpea genotypes

صفات و شاخص‌های گیاهی	Indirect effect via اثرات غیر مستقیم از طریق										جمع
Plant traits/ indices	SW	SPP	PHT	DM	DF	ELI	CATL	PROX	PROL	MSI	Sum
MSI	-0.136	-0.043	-0.155	0.023	0.063	-0.006	-0.014	-0.019	-0.078	**(0.556)**	0.189
PROL	-0.239	0.125	0.069	0.043	-0.225	0.010	-0.051	0.017	**(0.385)**	-0.089	0.145
PROX	-0.101	0.096	0.022	0.029	-0.106	-0.003	-0.050	**(-0.339)**	-0.023	0.031	0.453*
CATL	-0.094	-0.034	0.104	0.058	-0.122	0.001	**(-0.168)**	-0.104	0.149	0.045	-0.164
ELI	0.323	-0.158	-0.075	0.039	-0.100	**(-0.025)**	0.007	-0.005	-0.187	0.140	-0.041
DF	-0.205	0.121	0.091	0.073	**(-0.396)**	-0.005	-0.41	-0.071	0.220	-0.070	-0.387
DM	0.032	0.006	-0.214	**(0.210)**	-0.172	-0.005	-0.046	-0.047	0.100	0.060	-0.077
PHT	0.190	-0.041	**(-0.365)**	0.097	0.098	-0.004	0.037	0.017	-0.072	0.185	0.041
SPP	-0.415	**(0.330)**	0.043	0.003	-0.137	0.009	0.013	-0.076	0.138	-0.055	-0.037
SW	**(0.858)**	-0.213	0.103	0.008	0.119	-0.010	0.018	0.041	-0.135	-0.088	0.496*

*: معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد

*: Significant at 5% probability level

اثرات باقیمانده: ۰/۱۴۸

Residual effects: 0.148

ضریب تبیین تصحیح شده: ۰/۹۰۸

R^2adj.: 0.908

اعداد پررنگ در قطر ماتریس نشان دهنده اثرات مستقیم صفات بر عملکرد دانه هستند

Bold figures on the matrix diameter shows direct effects of traits on seed yield

SW: وزن ۱۰۰ دانه، SPP: تعداد دانه در غلاف، PHT: ارتفاع بوته، DM: روز از کاشت تا رسیدگی، DF: روز از کاشت تا گلدهی، ELI: نشت الکترولیت، CTAL: کاتالاز، PROX: پراکسیداز، PROL: پرولین، MSI: پایدای غشاء

SW: 100 Seed weight, SPP: Seed.pod^{-1}, PHT: Plant height, DM: Days to maturity, DF: Days to flowering, ELI: Electrolyte leakage index, CTAL: Catalase, PROX: Peroxidase, PROL: Proline, MSI: Membrane stability index

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این تحقیق، بیشترین میزان عملکرد دانه مربوط به ژنوتیپ‌های ۸ (FLIP 11-86C)، ۲ (FLIP 11-03C) و ۷ (FLIP 11-63C) بود. مقایسات گروهی نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین ژنوتیپ‌های وحشی و زراعی از لحاظ محتوای کلروفیل کل و میزان نشت الکترولیت‌ها بود. نتایج تجزیه همبستگی نشان داد که بیشترین میزان همبستگی بین عملکرد دانه و وزن ۱۰۰ دانه از یک طرف و فعالیت پراکسیداز از طرف دیگر وجود داشت. ژنوتیپ FLIP 11-56C از ویژگی‌های مناسبی به عنوان ژنوتیپ متحمل به سرما برخوردار بود، ولی عملکرد دانه آن پایین بود، بنابراین از این ژنوتیپ می‌توان به عنوان منبع تحمل به تنش به سرما در تحقیقات آینده استفاده کرد. ژنوتیپ‌های پرمحصول FLIP 11-86C (با عملکرد دانه ۸۸۹/۶ کیلوگرم در هکتار) و FLIP 11-03C (عملکرد دانه ۷۹۵/۷ کیلوگرم در هکتار) دارای نمره تحمل سرما برابر با ۳ و نشت الکترولیتی متوسط بودند و به عنوان ژنوتیپ‌های برتر نخود در این تحقیق شناخته شدند. شاخص پایداری غشاء و فعالیت آنزیم کاتالاز نیز به‌عنوان شاخص‌های مناسب برای به‌گزینی ژنوتیپ‌های متحمل به سرما در نخود شناخته شدند.

سپاسگزاری

از داوران محترم که در راهنمایی نگارندگان برای پربارتر شدن مقاله مساعدت کردند سپاسگزاری می‌شود. این مقاله از نتایج پروژه تحقیقاتی مشترک بین مؤسسهٔ تحقیقات کشاورزی دیم کشور و دانشگاه پیام نور به شماره ۹۸۱۰۱۹-۰۵۳-۱۵۵۱-۵۳-۳ استخراج شده است. نگارندگان بر خود واجب می‌دانند از کلیه افرادی که به‌نحوی در اجرای این پژوهش با مجریان طرح همکاری داشتند، تشکر و قدردانی نمایند.

منابع مورد استفاده

References

Abbo, S., Berger, J. and Turner, N.C. 2003. Evolution of cultivated chickpea: Four bottlenecks limit diversity and constrain adaptation. *Functional Plant Biology*, 30, pp.1081–1087. http://doi.org/10.1071/FP03084

Abbo, S., Lev-Yadun, S. and Galwey, N. 2002. Vernalization response of wild chickpea. *New Phytologist*, 154, pp.695–701. http://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00405.x

Abdollahi Hesar, A., Sofalian, O., Alizadeh, B., Asghari, A. and Zali, H. 2022. Investigation of frost stress on yield, yield components and a number of biochemical traits in rapeseed genotypes. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 15(2), pp.551-563. http://doi.org/10.22077/escs .2021. 3738.1903

Amandeep K., Gupta, N., Sharma, S., Singh, P. and Singh, S. 2022. Physiological and biochemical characterization of chickpea genotypes for cold tolerance at reproductive stage. *South African Journal of Botany*, 150, pp.488-499. http://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.08.011

Amini, S., Maali-Amiri, R., Kazemi-Shahandashti, S. S., López-Gómez, M., Sadeghzadeh, B., Sobhani-Najafabadi A. and Kariman, K. 2021. Effect of cold stress on polyamine metabolism and antioxidant responses in chickpea. *Journal of Plant Physiology*, pp. 258-259:153387. http://doi.org/10.1016/ j.jplph. 2021.153387

Anonymous. 2022. Report of the area, production and yield of agricultural crops in the cropping year 2020-21. Center of Information and Communication Technology, Ministry of Jihad-Agriculture, [In Persian].

Arslan, Ö., Eyidoğan, F. and Ekmekçi, Y. 2018. Freezing tolerance of chickpea: biochemical and molecular changes at vegetative stage. *Biologia Plantarum* 62, pp.140–148. http://doi.org/10.1007/s10535-017-0760-5

Ashraf, M. Y., Azim, A. R., Khan, A. H. and Ala S. A. 1994. Effect of water stress on total phenols, peroxidase activity and chlorophyll content in wheat (*Triticum aestivum* L.) *Acta Physiological Plantarum*, 16, pp.185-191.

Bates, L. S., Walden, R. P. and Teare, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39, pp.205-207. http://doi.org/10.1007/BF00018060

Blum, A. and Ebercon, A. 1981. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Science*, 21(1), pp.43-47. http://doi.org/10.2135/cropsci1981.0011183X002100010013x

Chance, B. and Maehly, A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidase. *Methods in Enzymology*, 2, pp.764-775. http://doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8

Croser, J. S., Clarke, H. J., Siddique K. H. M. and Khan, T. N. 2003. Low temperature stress: Implications for chickpea (*Cicer arietinum* L.) improvement. *Critical Reviews in Plant Science*, 22, pp.185–219. http://doi.org/10.1080/713610855

FAOSTAT. 2021. Crops. http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/Accessed 28, September, 2022.

Fowler, D. B., Gusta, L. V. and Tyler, N. J. 1981. Selection for winter hardiness in wheat. III. Screening methods. *Crop Science*, 21, pp.896-901. http://doi.org/10.2135/cropsci1979.0011183X001900060005x

Hasanian-Khoshrou, H. 2021. Physiological assessment and preliminary selection in annual wild *Cicer* species under cold stress. Final Report, Dryland Agricultural Research Institute, AREEO, No. 50322. [In Persian].

Hepburn, H. A., Naylor, R. E. L. and Stokes, D. T. 1986. Electrolyte leakage from winter barley tissue as indicator of winter hardiness. *Annals of Applied Biology*, 108, pp.164-65. http://doi.org/10.1111/aab.1986.108.s1.164

Kanouni, H., Farayedi, Y., Sabaghpour, S.H. and Saeid, S. 2016. Assessment of genotype×environment interaction effect on seed yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) lines under rainfed winter planting conditions. *Iranian Journal of Crop Sciences*, 18(1), pp.63-75. [In Persian].

Kanouni, H. 2020. An overview of chickpea breeding in Iran. Technical bulletin, Dryland Agricultural Research Institute, AREEO, No. 55945. [In Persian].

Kanouni, H. 2019. Final report of research project- Chickpea International Cold Tolerance Nursery (CICTN-2018). Dryland Agricultural Research Institute, AREEO, No. 56830. [In Persian].

Mafakheri, N., PourEsmail, M., Mansourifar, S. and Asilan, K.S. 2020. Physiological and biochemical traits variability in *Cicer* species. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Plant Biology)*, 33(1), pp. 183-196. [In Persian].

Mahajan, S. and Tuteja, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444, pp.139–158.

Mantri, N. L., Ford, R., Coram, T. E. and Pang, E. C. K. 2007. Transcriptional profiling of chickpea genes

differentially regulated in response to high-salinity, cold and drought. *BioMed Central Genomics*, 8, pp.1-14. http://doi.org/10.1186/1471-2164-8-303

Rakei, A., Maali-Amiri, R., Zeinali, H. and Ranjbar, M. 2016. DNA methylation and physio-biochemical analysis of chickpea in response to cold stress. *Protoplasma*, 253(1), pp.61-76. http://doi.org/10.1007/s00709-015-0788-3

Ritchie, S. W. and Nguyen, H. T. 1990. Leaf water content and gas exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop Science*, 30, pp.105-111. http://doi.org/10.2135/CROPSCI1990.0011183X003000010025X

Sharma, K. K. and Lavanya, M. 2002. Recent developments in transgenics for abiotic stress in legumes of the semi-arid tropics. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Work Report. pp.61-73.

Singh, K. B., Malhotra, R. S., Saxena, M. C. and Bejiga, G. 1997. Superiority of winter sowing over traditional spring sowing of chickpea in the Mediterranean region. *Agronomy Journal*, 89, pp.112–118. http://doi.org/10.2134/AGRONJ1997.00021962008900010017X

Tarinejad, A., Tahmasebpour, B. and Mohammadi, H. 2020. Investigation of relationships between grain yield, morphological and physiological traits in susceptible and drought tolerant cultivars of bread wheat. 8th National Conference on Applied Research in Agricultural Science, Nov. 6, 2020, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. [In Persian].

Toker, C. 2005. Preliminary screening and selection for cold tolerance in annual wild *Cicer* species. *Genetic Resourced and Crop Evolution*, 52, pp.1–5. http://doi.org/10.1007/s10722-005-1743-5

Yadav, S. S., Redden, R. J., Chen, W. and Sharma, B. 2007. Chickpea breeding and management. CAB, International. Wallingford, UK.

Zeitelhofer, M., Zhou, R. and Ottosen, C. O. 2022. Physiological responses of chickpea genotypes to cold and heat stress in flowering stage. *Agronomy*, 12(11), 2755. http://doi.org/10.3390/agronomy 12112755

Physiological and biochemical responses of wild and cultivated chickpea (*Cicer* spp.) germplasm to cold stress

Khalili M.[1], H. Kanouni[2] and K. Bahmani[3]

ABSTRACT

Khalili M., H. Kanouni and K. Bahmani. 2023. Physiological and biochemical responses of wild and cultivated chickpea (*Cicer* spp.) germplasm to cold stress**. Iranian Journal of Crop Sciences. 25(1): 71-87. (In Persian).**

This study was conducted to investigate the physiological and biochemical responses of wild and cultivated chickpea germplasm to cold stress, and to identify cold tolerant genotypes in field and controlled conditions. Twenty chickpea genotype including; 10 of cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes, eight wild chickpea (*Cicer reticulatum*) genotypes, and two cold-sensitive ILC 533 line and cold-tolerant (cv. Saral) controls were evaluated using randomized complete block design with three replications in the dry conditions of Saral agricultural research station, Kurdistan, Iran, in two cropping seasons (2019-20 and 2020-21). Agronomic and phenological traits were measured and recorded. Meanwhile, the chickpea genotypes were subjected to a gradual decrease in temperature in the growth chamber under controlled environment, and their biochemical and physiological traits were measured and recorded. Analysis variance showed that chickpea genotypes had significant differences for physiological traits such as peroxidase activity, electrolyte leakage and chlorophyll b content. Path analysis revealed that 100 seed weight traits followed by membrane stability and peroxidase activity had the most direct and positive effect on seed yield. The results of this experiment showed that high-yielding genotypes such as FLIP 11-86C (889.62 $kg.ha^{-1}$) and FLIP 11-03C (795.72 $kg\ ha^{-1}$) had cold tolerance rating score of three and moderate electrolyte leakage index, and were selected as superior cold tolerant genotypes.

Key words: Chickpea, Cold tolerance rating score, Enzyme activity, Membrane stability and Seed yield

Received: February, 2023 **Accepted: May, 2023**
1. Associate Prof., Payam Nour University, Tehran, Iran.
2. Associate Prof., Field and Horticultural Crops Sciences Research Department, Kurdistan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Sanandaj, Iran (Corresponding author) (Email: h.kanouni@areeo.ac.ir)
3. Researcher, Field and Horticultural Crops Sciences Research Department, Kurdistan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Sanandaj, Iran